



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/565, 31/57</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42108</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00353</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Februar 1999 (10.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 07 264.3 20. Februar 1998 (20.02.98) DE 198 21 831.1 15. Mai 1998 (15.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder: JENAPHARM GMBH & CO. KG [DE/DE]; Otto-Schott-Strasse 15, D-07745 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder: PATCHEV, Vladimir, Breite Strasse 10, D-07749 Jena (DE). OETTEL, Michael; Beethovenstrasse 30, D-07743 Jena (DE). THIEME, Ina; B. Siedlung 12, D-07612 Graitschen (DE). SCHWARZ, Sigfrid; Ot- togerd-Mühlmann-Strasse 17, D-07743 Jena (DE). RÖMER, Wolfgang; Iltisweg 39, D-07749 Jena (DE).</p> <p>(74) Anwalt: CRAMER, Eva-Maria; Jenapharm GmbH & Co. KG, Patentabteilung, Otto-Schott-Strasse 15, D-07745 Jena (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: PHARMACEUTICAL PREPARATIONS FOR SELECTIVELY SUPPLEMENTING OESTROGEN DEFICIENCY IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM</p> <p>(54) Bezeichnung: PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATE ZUR GEZIELTEN SUBSTITUTION DES ESTROGENMANGELS IM ZENTRALNERVENSYSTEM</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Selected steroids are used to produce pharmaceutical preparations for selectively supplementing oestrogen deficiency in the central nervous system (CNS) without influencing other organs or systems. These steroids are characterised in that they have a selective, neurotropic, oestrogen-like transcription effect, unlike the systemically active natural and synthetic oestrogens, including 17a-estradiol. It has been surprisingly discovered that the selected steroids, when used according to the invention, selectively influence the transcription of oestrogen-dependent genes in the central nervous system and cause alterations of the corresponding physiological parameters; have transcription effects specific to the central nervous systems in doses which have no biological effects on the tissues of the reproductive system; have transcription effects specific to the central nervous system at doses at which neither 17b-estradiol nor 17a-estradiol have any effect; and do not influence the transcription of oestrogen-dependent genes in the central nervous system to a greater extent than the secondary 17b-estradiol.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von ausgewählten Steroiden zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur gezielten Substitution des Estrogenmangels im Zentralnervensystem (ZNS) ohne Beeinflussung anderer Organe oder Systeme. Diese Steroide zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu systemisch wirksamen natürlichen und synthetischen Estrogenen, inklusive 17a-Estradiol, selektive neurotrophe estrogen-ähnliche Transkriptionswirkung besitzen. Es wurde überraschend festgestellt, daß die ausgewählten Steroide in ihrer erfindungsgemäßen Verwendung eine selektive Beeinflussung der Transkription estrogen-abhängiger Gene im ZNS und Veränderungen entsprechender physiologischer Parameter verursachen; ZNS-spezifische Transkriptionseffekte in solchen Dosen aufweisen, die in Geweben des Reproduktionssystems keine biologischen Effekte haben; ZNS-spezifische Transkription bei solchen Dosierungen aufweisen, in denen weder 17b-Estradiol, noch 17a-Estradiol, eine Wirksamkeit zeigen; und die Transkription estrogen-abhängiger Gene im ZNS nicht über die Wirkung von sekundär gebildetem 17b-Estradiol beeinflussen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

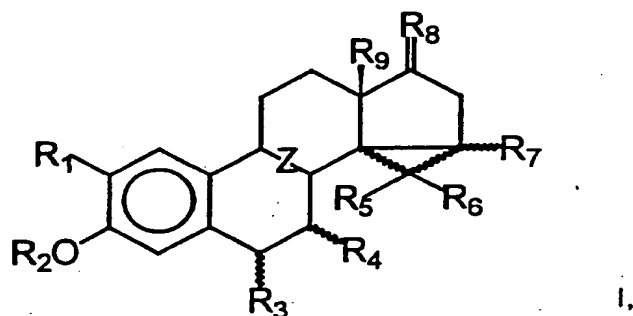
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Pharmazeutische Präparate zur gezielten Substitution des Estrogenmangels im Zentralnervensystem

Die Erfindung betrifft die Verwendung von ausgewählten Steroiden zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur gezielten Substitution des Estrogenmangels im ZNS ohne Beeinflussung anderer Organe oder Systeme.

Diese Steroide zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu systemisch wirksamen natürlichen und synthetischen Estrogenen, inklusive 17 α -Estradiol, selektive neurotrope estrogen-ähnliche Transkriptionswirkung besitzen.

Diese Steroide sind Verbindungen der allgemeinen Formel I



in der R₁ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkyl-
oxygruppe von 1 bis 5 C-Atomen darstellt, R₂ ein Wasserstoffatom, ei-
ne Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen, eine Acylgruppe von 1 bis 5 C-
Atomen, eine Gruppierung der allgemeinen Formel SO₂NR₁₀R₁₁, wobei
R₁₀ und R₁₁ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom, eine
Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen oder zusammen mit dem Stickstoff
eine Pyrrolidino-, Piperidino- oder Morpholinogruppe bedeuten, R₃ ein
Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe darstellt, R₄ ein Wasser-
stoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkylgruppe bis 5 C-Atomen
bedeutet, R₅ und R₆ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoff-
atom oder ein Halogenatom bedeutet, R₇ für ein Wasserstoffatom oder

eine Methylgruppe steht, R_8 ein Wasserstoffatom und eine Hydroxylgruppe, ein Oxogruppe oder eine Gruppierung der allgemeinen Formel $CR_{12}R_{13}$ bedeutet, in der R_{12} und R_{13} unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom oder ein Halogenatom darstellen, R_9 eine Methyl- oder Ethylgruppe bedeutet, Z für eine C,C-Doppelbindung oder einen substituierten oder unsubstituierten Cyclopropanring steht und die Gruppierung $>CR_5R_6$ entweder α -oder β -ständig angeordnet ist, wobei R_7 β -ständig ist, wenn $>CR_5R_6$ α -ständig ist und umgekehrt.

10 Eine abrupte oder allmähliche Abnahme der Estrogen-Konzentrationen im Organismus kann sowohl bei Frauen als auch bei Männern unter physiologischen (zunehmendes Alter, Menopause) und pathologischen Bedingungen (Gonadektomie, Einsatz von GnRH-Analoga als supplementäre Krebstherapie) auftreten.

15 Zu den bekanntesten klinischen Symptomen des Estrogen-Ausfalls gehören Störungen der Thermoregulation in der Form von Hitzewallungen, Osteoporose und erhöhte Prädisposition zu Herz- und Kreislauf-Erkrankungen (Netter A, The menopause. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), Reproduction in Mammals and Man, Ellipses, Paris, 627-642, 1993).

20 Neueste klinische Studien (van den Beld AW et al., The role of estrogens in physical and psychosocial well-being in elderly men, The Aging Male 1 (Suppl. 1), 54, 1998) haben eindeutige Beweise für eine Senkung der Serum-Estrogenspiegel mit zunehmendem Alter beim Mann erbracht. Dadurch wird das Vorhandensein und die pathophysiologische Relevanz eines "Estrogen-Mangelsyndroms" beim alternden Mann unterstrichen.

Das Gehirn stellt ein sehr wichtiges Zielorgan der Estrogenwirkung dar. 30 Estrogene haben einen entscheidenden physiologischen Einfluß auf viele neurobiologische Prozesse. Ihre Effekte lassen sich im allgemeinen in zwei großen Gruppen -organisierende und aktivierende - klassifizieren (McEwen BS et al., Steroid hormones as mediators of neural plasticity, J Steroid Biochem Mol Biol 39: 223-232, 1991).

Die Ersteren betreffen hauptsächlich die geschlechtsspezifische Organisation neuraler Substrate während der frühen Ontogenese.

Die zweite Gruppe umfaßt spezifische Veränderungen in der Funktion neuraler Regelkreise unter dem Einfluß von Estrogenkonzentrationen, die aus der physiologischen Sekretion der Gonaden nach der Geschlechtsreife resultieren. Die aktivierenden Effekte von Estrogenen im ZNS kommen u.a. bei den folgenden physiologischen Prozessen zum Ausdruck:

geschlechtsspezifische Regulation der Gonadotropin-Sekretion (Fink G, Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil E, Neil JD (eds), The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York, 1349-1376, 1988),

Steuerung des Sexualverhaltens (Baum MJ et al., Hormonal basis of proceptivity and receptivity in female primates, Arch Sex Behav 6: 173-192, 1977),

Regulation der neuroendokrinen Reagibilität auf Stress (Viau V, Meaney MJ, Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat, Endocrinology 129: 2503-2511, 1991),

Lernen und Retention von Verhaltensmustern mit adaptiver Relevanz (O'Neal MF et al., Estrogen affects performance of ovariectomized rats in a two-choice water-escape working memory task, Psychoneuroendocrinology 21: 51-65, 1996),

Aufrechterhaltung der Reaktionsbereitschaft von neurochemischen Mechanismen, die für die Gewährleistung der Vigilanz und adäquaten Informationsverarbeitung unentbehrlich sind (Fink G et al., Estrogen control of central neurotransmission: effects on mood, mental state and memory, Cell Mol Neurobiol 16: 325-344, 1996),

dynamische Veränderungen der Dichte interneuronaler Kontakte in Hirnstrukturen mit entscheidender Rolle für die kognitive Leistung und den emotionalen Status (Wooley CS, McEwen BS, Estradiol mediates fluctuations in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. J Neurosci 12: 2549-2554, 1992).

- Das normale neurotrope Potential von Estrogenen findet in Ausdruck in ihrer Fähigkeit, die Expression von einer Reihe von ZNS-spezifischen Genen zu induzieren, deren Produkte für das Überleben von Nervenzellen von kritischer Bedeutung sind (Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand CD, Presumptive estrogen target neurons express mRNA for both the neurotrophins and neurotrophin receptors: a basis for potential development interactions of estrogen with the neurotrophins, *Mol Cell Neurosci* 4: 510-525, 1993),
- 10 die Vielfalt und Qualität der Signalübertragung im ZNS (Luine VN Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats, *Exp Neurol* 89: 489-490, 1985); (Weiland N, Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus, *Endocrinology* 131: 2697-2702, 1992); (Bossé R, Di Paolo T, The modulation of brain dopamine and GABA_A receptors by estradiol: a clue for CNS changes occurring at menopause, *Cell Mol Neurobiol* 16: 199-212, 1996), zu gewährleisten
- 15 und die Resistenz von Nervenzellen gegenüber pathologischen Einwirkungen zu erhöhen (Goodman Y et al., Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons, *J Neurochem* 66: 1836-1844, 1996).
- 25 Klinische Befunde implizierten den Estrogenmangel als kausalen Faktor in der Pathogenese des Morbus Alzheimer und deuten auf die Möglichkeit einer Estrogen-Substitution, die klinische Manifestation bzw. Progredienz dieser Erkrankung aufzuhalten (Henderson VW et al., Estrogen replacement therapy in older women: comparisons between
- 30 Alzheimer's disease cases and controls, *Arch Neurol* 51: 896-900, 1994); (Paganini-Hill A, Henderson VW, Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease, *Am J Epidemiol*, 140: 256-261, 1994).
- Eine Reihe von Neuropeptiden, deren Genexpression durch physiologische Estrogenmengen beeinflusst wird (z.B. Oxytocin und Arginin-

Vasopressin) spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung emotionaler Verhaltenskomponenten (Adan RA, Burbach JP, Regulation of vasopressin and oxytocin gene expression by estrogen and thyroid hormone, Progr Brain Res 92: 127-136, 1992).

5

Berichte in der Fachliteratur weisen darauf hin, daß Estrogenmangel mit einer deutlichen Abschwächung der Fähigkeit des Organismus, reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale zu eliminieren, einhergeht (Niki E, Nakano M, Estrogens as antioxidants. Methods Enzymol 186: 330-333, 1990) ; (Lacort M et al., Protective effects of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro, Lipids 30: 141-146, 1995). Der Überschuß an freien Radikalen wird in Mechanismen der zellulären Schädigung in mehreren Organen und Systemen impliziert und mit der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang gebracht (Smith CD et al., Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10540-10543, 1991); (Hastings TG, Zigmond MJ, Neurodegenerative disease and oxidative stress: insights from an animal model of Parkinsonism. In: Fiskum G (ed), Neurodegenerative Diseases, Plenum Press, New York, 37-46, 1996). Daher wird der Estrogen-Substitution auch eine Rolle im Sinne der Aufrechterhaltung und Erhöhung der endogenen antioxidativen Kapazität beigemessen (Behl C et al., 17 β -Estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro, Biochem Biophys Res Commun 216: 473-482, 1995).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Estrogen-Substitution mit natürlichen und synthetischen Estrogenen, deren Wirkung in allen Estrogenrezeptor-enhaltenden Organen und Systemen auftritt, d.h. praktisch im gesamten Körper. Da jedoch diese Estrogene bereits in geringen pharmakologischen Dosen eine starke Zellproliferation in Geweben des weiblichen Genitaltraktes (Endometrium) und dem Brustdrüsenepithel verursachen, die schließlich in einer karzinogenen Entdifferenzierung ausarten, ist ihre Anwendung für die Therapie von Symptomen ei-

nes Estrogen-Mangels im ZNS durch mehrere Gegenindikationen begrenzt (Bernstein BA, Ross RK, Henderson BE, Relationship of hormone use to cancer risk. J Natl Cancer Inst Monograph 12: 137-147, 1992).

5

Die proliferativen Effekte von Estrogenen gelten als unmittelbare Risikofaktoren für die Entstehung einer benignen Prostata-Hyperplasie und/oder Gynäkomastie beim Mann (Knabbe C, Endokrine Therapie von Prostataerkrankungen. In: Allolio B Schulte HM (eds), Praktische Endokrinologie, Urban & Schwarzenberg, München, 645-651, 1996).

10

Aus diesem Grund wurde die Estrogen-Substitution beim Mann, trotz erwiesenen Indikationen, nie ernsthaft in Erwägung gezogen.

Die Verwendung von natürlichen und synthetischen Estrogenen mit systemischer Wirkung - d.h. in allen Organen und Systemen des Körpers - zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wird durch die folgenden Patente beansprucht:

15

US 4,897,389, US 5,554,601 und WO 95/12402, WO 97/03661, DE 43 38 314 C1.

20

- US 4,897,389 schützt die Anwendung von Estradiol, Estron und Estriol, allein oder in Kombination mit Gonadotropinen, Androgenen, anabolen Androgenen oder humanem Wachstumshormon, zur Behandlung seniler Demenz, Morbus Parkinsoni, zerebraler Atrophie, Morbus Alzheimeri, zerebellarer Atrophie, senilem oder

25

essentiellem Tremor.
- US 5,554,601 und WO 95/12402 schützt die Anwendung von estrogenen Substanzen, darunter auch solche, die eine geringfügige "sexuelle Aktivität" aufweisen, zur Protektion von Nervenzellen vor progredienter Schädigung und dem Zelltod, und zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Als Beispiel für eine Substanz mit geringfügiger "sexueller Aktivität" und neuroprotektiver Wirkung wird 17a-Estradiol angeführt.

30

- WO 97/03661 schützt die Anwendung von nicht-estrogenen Substanzen, die in ihrer Struktur mindestens zwei Ringstrukturen auf-

weisen, wobei mindestens eine davon ein terminaler phenolischer Ring ist, und deren Molekulgewicht weniger als 1000 Dalton beträgt, zur Gewährleistung von Neuroprotektion.

- DE 43 38 314 C1 beschreibt Steroide mit phenolischer A-Ring-Struktur, deren radikalfangenden und antioxidativen Eigenschaften unabhängig vom Maß der estrogen-ähnlichen Wirksamkeit sind. Diese Verbindungen können zur Prophylaxe und Therapie radikalvermittelter Zellschädigungen eingesetzt werden.

In all diesen Patentschriften soll die therapeutische und neuroprotektive Effizienz der enthaltenen Substanzen auf einen oder mehrere der folgenden Endeffekten basieren:

- Stimulation der Biosynthese von natürlichen neuronalen Wachstumsfaktoren;
- Stimulation der Aktivität von Acetylcholin-synthetisierenden Enzymen bzw. der Aufnahme (Uptake) von Substraten der Acetylcholin-Synthese;
- direkte Zytoprotektion durch Erhöhung der Resistenz von Nervenzellen gegenüber dem Entzug von Nährsubstraten bzw. Wachstumsfaktoren;
- Verminderung der Empfindlichkeit von Nervenzellen gegenüber freien Radikalen und reaktiven Sauerstoff-Spezies, die infolge einer traumatischen bzw. neurotoxischen Einwirkung freigesetzt werden.

Jedoch werden in keiner der aufgeführten Patentschriften Steroide mit selektiven estrogen-ähnlichen neurotrophen Transkriptionseffekten dargestellt; d.h. solche, die bei einer Dosierung in vivo, die im reproduktiven System keine signifikante biologische Wirkung zeigen, die Transkription estrogen-abhängiger Gene im ZNS in einem estrogen-ähnlichen Modus beeinflussen.

Insbesondere gilt es zu unterstreichen, daß die in den Patentschriften US 5,554,601 und WO 95/12402 beschriebene Wirkung von 17a-Estradiol - einer Substanz, die eine reduzierte Estrogenität im Genitaltrakt aufweist (Clark JH et al., Effects of estradiol 17a on nuclear occupancy of the estrogen receptor, stimulation of nuclear type II sites, and

uterine growth, J Steroid Biochem 16: 323-328, 1982) - sich nur auf die Protektion von kultivierten Nervenzellen vor dem durch den Entzug von Nährmittel induzierten Zelltod bezieht, wobei die relative Potenz von 17a-Estradiol mit derjenigen von 17b-Estradiol nicht evaluiert wurde.

5 Daraus kann man schlußfolgern, daß aus den bisher veröffentlichten Untersuchungen und Patentschriften jegliche Hinweise für eine selektive neurotrope Wirkung von 17a-Estradiol bzw. seinen Derivaten fehlen, während 17b-Estradiol bekanntlich keine ZNS-Selektivität aufweist und damit als ein Estrogen mit systemischer Wirkung einzustufen ist. Die

10 Patentschriften WO 97/03661 und DE 43 38 314 C1 interpretieren die zytoprotektive Wirkung von Estrogenen für eine Konsequenz der radikalfangenden Eigenschaften ihres terminalen phenolischen A-Rings. Eine dissoziierte neurotrope Wirkung von 17a-Estradiol, die auf einer Beeinflussung der Transkription von estrogen-sensitiven Genen ba-

15 siert, wurde weder innerhalb der Patentschrift untersucht, noch wurde in der Literatur darüber berichtet.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, pharmazeutische Präparate

20 zur gezielten Substitution des Estrogenmangels im Zentralnervensystem (ZNS) ohne Beeinflussung anderer Organe oder Systeme zu finden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ausgewählte

25 Steroide zur Herstellung pharmazeutischer Präparate verwendet werden, die die Substitution des Estrogenmangels im ZNS ohne Beeinflussung anderer Organe oder Systeme gewährleisten.

Die Steroide zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu systemisch wirksamen natürlichen und synthetischen Estrogenen, inklusive 17a-Estradiol, selektive neurotrope estrogen-ähnliche Transkriptionswirkung besitzen.

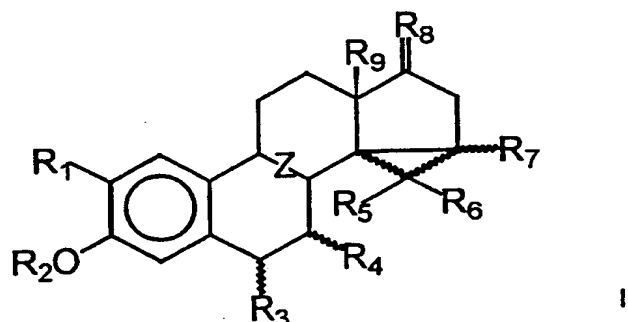
30

Es wurde überraschend festgestellt, daß die ausgewählten Steroide in

35 ihrer erfindungsgemäßen Verwendung

- eine selektive Beeinflussung der Transkription estrogen-abhängiger Gene im ZNS und Veränderungen entsprechender physiologischer Parameter verursachen;
- ZNS-spezifische Transkriptionseffekte in solchen Dosen aufweisen, die in Geweben des Reproduktionssystems keine biologische Effekte haben;
- ZNS-spezifischen Transkriptionseffekte bei solchen Dosierungen aufweisen, in denen weder 17b-Estradiol, noch 17a-Estradiol, eine Wirksamkeit zeigen;
- und die Transkription estrogen-abhängiger Gene im ZNS nicht über die Wirkung von sekundär gebildetem 17b-Estradiol beeinflussen.

Diese Steroide sind Verbindungen der allgemeinen Formel I



- in der R₁ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen darstellt, R₂ ein Wasserstoffatom, eine Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen, eine Acylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen, eine Gruppierung der allgemeinen Formel SO₂NR₁₀R₁₁, wobei R₁₀ und R₁₁ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom, eine Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen oder zusammen mit dem Stickstoff eine Pyrrolidino-, Piperidino- oder Morpholinogruppe bedeuten, R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe darstellt, R₄ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkylgruppe bis 5 C-Atomen bedeutet, R₅ und R₆ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoff-

atom oder ein Halogenatom bedeuten, R_7 für ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe steht, R_8 ein Wasserstoffatom und eine Hydroxylgruppe, ein Oxogruppe oder eine Gruppierung der allgemeinen Formel $CR_{12}R_{13}$ bedeutet, in der R_{12} und R_{13} unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom oder ein Halogenatom darstellen, R_9 eine Methyl- oder Ethylgruppe bedeutet, Z für eine C,C-Doppelbindung oder einen substituierten oder unsubstituierten Cyclopropanring steht und die Gruppierung $>CR_5R_6$ entweder α -oder β -ständig angeordnet ist, wobei R_7 β -ständig ist, wenn $>CR_5R_6$ α -ständig ist und umgekehrt.

10

Bevorzugte Verbindungen sind

- 15 $15\beta H, 3'H$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol,
- $15\beta H, 3'H$ -Cycloprop[14,15]-18a-homo-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -ol,
- 15 17 α -Hydroxy- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-yl-pentanoat,
- 17-Methylen- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-ol,
- $15\beta H, 3'H$ -3',3'-difluoro-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol,
- 20 17-Methylen- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-yl-sulfamat,
- 17-Difluoromethylen- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-ol,
- 3-Methoxy- 15β -methyl- $3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-
- 25 3-ol,
- 15α -Methyl- $3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol,
- 17-Difluoromethylen- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-yl-(tetramethylenimino)sulfonat,
- 17-Methylen- $3'H$ -cycloprop[8,9]- $15\beta H, 3'H$ -cycloprop[14,15]-estra-
- 30 1,3,5(10)-trien-3-ol.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist die erfindungsgemäße Verwendung der Verbindungen zur Herstellung pharmazeutischer

Präparate zur Prophylaxe und Therapie der altersabhängigen Verminderung der kognitiven Leistung, der altersbedingten und perimenopausalen Dysphorie, des premenstruellen Syndroms, der Neurose und Neurasthenie, von Angstzustände und -neurosen, von Hitzewallungen
5 nach Estrogen-Deprivation (Menopause, Gonadektomie, Behandlung mit GnRH-Analoga) und der psychogenen Hemmung des Sexualverhaltens.

Es wurde festgestellt, daß dabei das Risiko einer Beeinträchtigung hormonsensitiver Gewebe des Reproduktionssystems (Endometrium,
10 Myometrium, Prostata, Brustdrüse) im Sinne einer unkontrollierter Proliferation und Karzinogenese weitgehend ausgeschlossen werden kann.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate zur oralen und parenteralen, incl. topischen, rektalen, subcutanen, intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen, intranasalen, intravaginalen, intrabukkalen oder sublingualen Applikation, die neben üblichen Träger- und Verdünnungsmitteln eine in dem Anspruch
20 1 aufgezeigte Verbindung als Wirkstoff enthalten.

Als pharmazeutische Formulierungen können zur Anwendung kommen:

- Tabletten oder Dragees von 0,1 bis 2 mg täglich oral,
- Ampullen von 0,1 bis 2 mg täglich als subkutane Injektion,
- 25 - Pflaster mit transdermaler Freisetzung von 0,05 bis 2 mg täglich,
- subkutane Implantate mit täglicher Freisetzungskapazität von 0,05 bis 2 mg,
- Gele und Cremen mit transdermaler Freisetzung von 0,05 bis 2 mg täglich,
- 30 - bukkal applizierbare Systeme mit einer täglichen Freisetzung von 0,1 bis 1 mg.

Die Arzneimittel der Erfindung werden mit den üblichen festen oder flüssigen Trägerstoffen oder Verdünnungsmitteln und den üblicherweise
35 verwendeten pharmazeutisch-technischen Hilfsstoffen entspre-

chend der gewünschten Applikationsart mit einer geeigneten Dosierung in bekannter Weise hergestellt.

- 5 Am Beispiel von $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (Verbindung der allgemeinen Formel I:
 $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=\text{H}$; $R_8=\alpha\text{-OH}$, $\beta\text{-H}$; $R_9=\text{CH}_3$;
 $Z=\text{C,C-Doppelbindung}$) - nachfolgend in den Figuren als Prototypsubstanz dokumentiert- wird die erfindungsgemäße selektive estrogenähnliche Wirkung experimentell im Vergleich mit 17b-Estradiol und 17a-Estradiol nachgewiesen.

Beispiel 1

- Einfluß auf das Uterusgewicht nach chronischer subkutaner Applikation in vivo

Geschlechtsreife (drei Monate alt, Gewicht 250 ± 30 g) weibliche Wistar-Ratten (Tierzucht Schönwalde GmbH, Deutschland) wurden unter Ketamin-Narkose ovariectomiert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere subkutan mit osmotischen Minipumpen (Alzett, USA) implantiert, die eine Tagesdosis von 0,01, 0,1, 0,3, 1, 3, 30 und 100 μg der zu untersuchenden Substanzen ($15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, 17b-estradiol und 17a-estradiol) über 7 Tage freisetzen; die Kontrolltiere erhielten ein entsprechendes Volumen an Vehikel (Propylenglykol). Am 7. Behandlungstag wurden die Tiere getötet und die Uterus-Feuchtgewichte (bezogen auf 100 g Körpergewicht) ermittelt.

Fig. 1 zeigt die uterotrope Wirkung von verschiedenen Dosen von 17b-Estradiol (Rechteck-Symbole), 17a-Estradiol (Kreis-Symbole) und $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, (Dreieck-Symbole) bei ovariectomierten Ratten. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von 7-10 Versuchstieren dar; das

schattierte Feld zeigt die Streubreite dieses Parameters in Placebo-behandelten Tieren (OVX).

Es ist ersichtlich, daß mit 17b-Estradiol eine signifikante Vergrößerung des Uterus bereits bei Tagesdosen von 0,03 bis 0,1 µg erzielt wurde. Für einen vergleichbaren uterotropen Effekt benötigte man Tagesdosen von 100 µg 17a-Estradiol bzw. 30 µg der Substanz 15βH,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17α-diol.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wirksamkeit von 15βH,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17α-diol im weiblichen Genitaltrakt etwa 1000-fach geringer als diese von 17b-Estradiol und vergleichbar mit derjenigen von 17a-Estradiol ist.

Beispiel 2

15 Aktivierung der Transkription eines α-Estrogenrezeptor-abhängigen Reportergens in vitro

Brustkrebszellen MCF-7/2A, die die Alpha-Isoform des Estrogenrezeptors (ERα) exprimieren, wurden mit dem Reporter-Plasmid EREwtcLUC stabil transfiziert. Der Reporter enthält den Estrogen-Response Element (ERE) von Vitellogenin, einen Thymidinkinase-Promotor und das Luciferase-codierende Gen von *Photinus pyralis*. Die Zellkultur wurde für 7 Tage vor Beginn des Experiments in steroid-freiem Medium kultiviert und anschließend mit 17b-Estradiol, 17a-Estradiol bzw. der Substanz 15βH,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17α-diol in vier verschiedenen Konzentrationen (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} und 10^{-8} M) für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Transkription des Luciferase-Reportergens wurde durch Bestimmung der Luciferase-Aktivität mit einem spezifischen Testansatz (Serva/Promega, Deutschland) ermittelt.

Fig.2 zeigt die Induktion der Transkription eines stabil transfizierten estrogen-abhängigen Reporter-Gens (Luciferase) in Estrogenrezeptor-

exprimierenden Brustkrebszellen MCF-7 nach 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Dosen von 17b-Estradiol (Rechteck-Symbole), 17a-Estradiol (Kreis-Symbole) und 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (Dreieck-Symbole). Die Figur stellt die
5 Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen dar.

Es ist ersichtlich, daß die untersuchten Substanzen dosis-abhängig die Transkription des Reporters stimulieren. Die Effizienz von 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol und 17a-Estradiol ist um eine Größenordnung (d.h. 10-fach) geringer als diese
10 von 17b-Estradiol.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Substanz 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol eine um das mehrfache schwächere Estrogenwirkung in Brustkrebs-Gewebe hat.

15

Beispiel 3

Stimulation der Transkription des Oxytocin-Gens im Gehirn nach chronischer Behandlung in vivo mit Dosen, die am Uterus unwirksam sind

20

Geschlechtsreife (drei Monate alt, Gewicht 250 \pm 30 g) weibliche Wistar-Ratten (Tierzucht Schönwalde GmbH, Deutschland) wurden unter Ketamin-Narkose ovariectomiert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere subkutan mit osmotischen Minipumpen (Alzett, USA) implantiert, die eine Tagesdosis von 0,01, 0,1 und 1 μ g der zu untersuchenden Substanzen
25 (15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, 17b-estradiol und 17a-estradiol) über 7 Tage freisetzen; die Kontrolltiere erhielten ein entsprechendes Volumen an Vehikel (Propylenglykol). Unmittelbar nach der Tötung der Tiere, wurden die
30 Uterus-Feuchtgewichte (bezogen auf 100 g Körpergewicht) ermittelt. Die Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), die die Biosynthese von Oxytozin codiert, wurde durch in-situ-Hybridisierung mit einer spezifischen radioaktiv-markierten Oligodeoxynukleotid-Sonde nach einer

etablierten Methode (Fischer D et al, Lactation as a model of naturally reversible hypercorticalism: plasticity in the mechanism governing hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the rat, J Clin Invest 96: 1208-1215, 1995), 1995) im hypothalamischen Nucleus paraventricularis (PVN) dargestellt. Behandlungsbedingte Veränderungen in der Transkription des Oxytocin-Gens wurden durch densitometrische Messungen der spezifischen Hybridisierungssignale innerhalb der definierten anatomischen Strukturen quantifiziert.

Fig. 3 zeigt die Induktion von Oxytozin-codierenden Transkripten (OT mRNA; obere Graphik) im hypothalamischen paraventriculären Nucleus ovariectomierter Ratten nach chronischer subkutaner Behandlung mit 17 β -Estradiol (Kreis-Symbole), 17 α -Estradiol (Rechteck-Symbole) und 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (Dreieck-Symbole) in drei verschiedenen Dosierungen. Die untere Graphik zeigt die Effekte der getesteten Substanzen auf das Uterusgewicht. Jeder Punkt stellt $x \pm \text{SEM}$ von 5-7 Einzelbestimmungen. Das schattierte Feld zeigt die Streubreite des entsprechenden Parameters in Vehikel-behandelten Ratten. Die Sternzeichen bezeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (OVX).

Die Ergebnisse zeigen, daß 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol die Transkription des Oxytozin-Gens im PVN dosisabhängig stimuliert, wobei der Stimulationseffekt demjenigen von 17 β -Estradiol sehr ähnlich ist. Allerdings sind die neurotrophen Transkriptionseffekte von 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, unterschiedlich als bei 17 β -Estradiol, mit keiner Uterus-Vergrößerung assoziiert. In den verwendeten Dosierungen hatte 17 α -Estradiol keinen Einfluß auf die Konzentrationen von Oxytozin-mRNA im hypothalamischen PVN.

Diese Ergebnisse dokumentieren eine selektive estrogen-ähnliche Wirkung von $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol im Gehirn der weiblichen Ratte.

5

Beispiel 4

Stimulation der Transkription des antiapoptotischen Gens bcl-2 im Hippokampus nach chronischer Behandlung in vivo mit Dosen, die keine uterotrope Wirkung zeigen

- 10 Das Untersuchungsmaterial stammte von Tieren, die im unter Beispiel 3 beschriebenen Experiment behandelt wurden. Das Gen bcl-2 codiert die Synthese eines Proteins, das in der Kaskade der Zellproliferation involviert ist und dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgegenwirkt (Merry DE, Korsmeyer SJ, Bcl-2 gene family in the nervous system, 15 Ann Rev Neurosci 20: 245-267, 1997). Die Transkription dieses Gens wird durch Estrogene stimuliert (Kandouz M et al., Antagonism between estradiol and progestin on Bcl-2 expression in breast cancer cells, Int J Cancer 68: 120-125, 1996).
- 20 Gyrus dentatus ist ein Bestandteil der hippokampalen Formation, in dem die Neurogenese bei der Ratte auch im Erwachsenenalter persistiert (Gould E et al, Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress, Proc Natl Acad Sci USA 96: 3168-317, 1998) und bcl-2 exprimiert ist. Bcl-2-Transkripte wurden in Hirnschnitten durch in-situ-Hybridisierung mit einer spezifischen Oligonukleotid-Sonde (Clark RSB et al., Apoptosis-suppressor 25 gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats, J Neurosci 17: 9172-9182, 1997) dargestellt, und nach der im Beispiel 3 beschriebenen Methode densitometrisch quantifiziert.
- 30 Fig. 4 zeigt den Einfluß von drei verschiedenen Dosen von 17 β -Estradiol (Kreis-Symbole), 17 α -Estradiol (Rechteck-Symbole) und $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (Dreieck-Symbole) auf die Expression von bcl-2 im Gyrus dentatus des

Hippokampus ovariectomierter Ratten; Zeichen und Abkürzungen wie in Fig. 3.

Die Behandlung mit der Substanz $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-
5 1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol resultierte in einer dosisabhängigen Stimulation der Expression von bcl-2 im Gyrus dentatus. Der Effekt war mit demjenigen, der durch gleiche Dosen 17 β -Estradiol ausgelöst wurde, identisch. Die Substanz 17 α -Estradiol hatte in den verwendeten Dosierungen keinen Effekt auf die Transkription von bcl-2 - ersichtlich
10 aus Figur 4.

Diese Ergebnisse zeigen, daß in der verwendeten Dosierung, $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol die Transkription des antiapoptotischen Gens bcl-2 im ZNS nach einem estrogen-ähnlichen Modus beeinflusst, ohne daß eine Wirkung am Uterus auftritt.
15

Beispiel 5

Dissoziierte Induktion von Oxytozin-Rezeptoren im Gehirn und im Myometrium

20

Bindungsstellen mit identischen biochemischen Charakteristika für das Peptidhormon Oxytozin sind im Myometrium und im ZNS vorhanden. In beiden Organen verursacht akute oder chronische Estrogen-Behandlung einen Anstieg der Anzahl (Dichte) von Oxytozin-
25 Rezeptoren. Die Hirnstrukturen, in denen dieser Parameter besonders empfindlich auf Estrogene reagiert, sind Nucleus interstitialis striae terminalis, Nucleus ventromedialis und der amygdaloide Nuklearkomplex. Estrogen-bedingte Induktion von Oxytozin-Rezeptoren in diesen Strukturen befindet sich in einer kausalen Relation zur Ausprägung von
30 einer Reihe von prosozialen Verhaltensmustern, darunter auch Sexualverhalten (Insel TR, Oxytocin - a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies, Psychoneuroendocrinology 17: 3-35, 1992).

Zu Bestimmungen der Dichte von Oxytozin-Rezeptoren in definierten anatomischen Strukturen ist die autoradiographische Darstellung durch Bindung des radioaktiv markierten Oxytozin-Rezeptorantagonisten $d(CH_2)_5\text{-Tyr(Me)}^2$, Thr^4 , Orn^8 - $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^9$ -Vasotocin (^{125}I -OVTA) die Methode der Wahl (Kremarik P et al., Histoautoradiographic detection of oxytocin- and vasopressin-binding sites in the telencephalon of the rat, J Comp Neurol 333: 343-359, 1993).

Gefrierschnitte vom Gehirn und Uterus von ovariectomierten Ratten, die 7 Tage lang eine tägliche subkutane Dosis von 1 μg $15\beta\text{H},3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, 17b-Estradiol bzw. 17a-Estradiol erhielten (vgl. Beispiel 3), wurden mit ^{125}I -OVTA (NEN DuPont, Deutschland) in einer Konzentration von 50 pM inkubiert. Anschließend wurden Filmautoradiogramme erstellt, die zur densitometrischen Bestimmung der Oxytozin-Bindungsstellen nach einem etablierten Verfahren verwendet wurden (Patchev VK et al., Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. Neuroscience 57: 537-543, 1993).

Fig. 5 zeigt die spezifische Bindung eines ^{125}I -markierten Liganden des Oxytozin-Rezeptors (^{125}I -OVT) im Myometrium und in zwei estrogen-sensitiven Hirnstrukturen, dem hypothalamischen ventromedialen Nucleus (VMN) und dem Nucleus interstitialis striae terminalis (BNST), nach einer 7-tägigen Behandlung mit 17b-Estradiol (schwarze Säulen), 17a-Estradiol (schraffierte Säulen) und $15\beta\text{H},3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (graue Säulen) in einer Tagesdosis von 1 μg . Die Sternzeichen zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zu Placebo-behandelten ovariectomierten Ratten (OVX). Die rechte Graphik stellt die Effekte der getesteten Substanzen auf die Proliferation des Endometriums dar. Jede Säule repräsentiert $x \pm \text{SEM}$ von 4-5 Einzelbestimmungen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind ebenfalls auf Fig. 5 dargestellt. Die Behandlung mit 17b-Estradiol und $15\beta\text{H},3'\text{H}$ -

Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol resultierte in einem signifikanten Anstieg der Dichte von Oxytozin-Rezeptoren in allen untersuchten Hirnstrukturen, wobei 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol im VMN einen schwächeren Effekt als 17b-Estradiol zeigte. Die Substanz 17a-Estradiol war bei der verwendeten Dosierung in keiner Hirnstruktur wirksam. Im Myometrium verursachte 17b-Estradiol eine starke Induktion von Oxytozin-Bindungsstellen, während 17a-Estradiol und die Substanz 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol eine signifikant geringere Wirkung zeigten. Die computer-gestützte Messung der Stärke des Endometriums in den Uteruspräparaten zeigte, daß die Tagesdosis von 1 μ g 17b-Estradiol eine signifikante endometriale Proliferation verursacht, während 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol und 17a-Estradiol in einer äquivalenten Dosierung die Stärke des Endometriums nicht beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen die unter Beispiel 5 dargestellten Resultate, daß die Substanz 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol einen biochemischen Parameter - den Oxytozin-Rezeptor - der sowohl für das reproduktive System (Myometrium) als auch für das ZNS charakteristisch ist, vorwiegend im Zentralnervensystem beeinflusst und sich durch diese selektive neurotrope Wirkung von den natürlichen Estrogenen 17b-Estradiol und 17a-Estradiol qualitativ unterscheidet.

25

Beispiel 6

Beeinflussung der kognitiven Funktionen nach chronischer Behandlung

Es ist bekannt, daß eine Verminderung der Estrogenkonzentrationen mit einer Erniedrigung der Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert ist (Kopera H, Estrogens and psychic functions. Aging and estrogens, Front Hormone Res. 2: 118-133, 1973).

Eine Korrelation zwischen Serum-Estrogenspiegel und kognitiver Leistung wurde auch im Tierversuchsmodell nachgewiesen (Kondo Y, Suzuki K, Sakuma Y, Estrogen alleviates cognitive dysfunction following transient brain ischemia in ovariectomized gerbils, *Neurosci Lett* 238: 45-48, 1997).

Zur Vergleichsuntersuchung des Einflusses der Substanzen $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, 17b-Estradiol und 17a-Estradiol auf die kognitive Leistung wurde das folgende Experiment durchgeführt:

- 10 Geschlechtsreife weibliche Wistar-Ratten (Gewicht 240 ± 20 g) wurden unter Nembutal-Narkose ovariectomiert. Eine Woche nach der Operation wurde mit täglicher subkutaner Verabreichung der Substanzen in den folgenden Tagesdosen begonnen: 17b-Estradiol, 1 μg ; 17a-Estradiol, 100 μg ; $15\beta\text{H}, 3'\text{H}$ -Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-
- 15 tetraen-3,17 α -diol, 30 μg . Die gesamte Behandlungsdauer war 14 Tage. Am 5. und 6. Behandlungstag wurden Trainingssitzungen zum Erlernen eines konditionierten Escape-Verhaltens nach einer etablierten Methode (Diaz-Veliz G et al., Influence of the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned
- 20 avoidance responses in rats, *Physiol Behav* 46: 397-401, 1989) durchgeführt. Jedes Tier wurde in einer Sitzung 50 Mal der Kombination aus einem unbedingten (elektrische Reizung) und zwei konditionierenden Stimuli (Licht- und Schall-Signal) exponiert. Am 7. Behandlungstag wurde die Retention des erlernten Verhaltensmusters getestet. Nach
- 25 einer 6-tägigen Unterbrechung der Lernsitzungen, wurde am 14. Behandlungstag die Extinktion des erlernten konditionierten Verhaltens ermittelt. Die Anzahl der korrekten Verhaltensreaktionen (Escape in das "sichere" Abteil des Apparats innerhalb von drei Sekunden nach Präsentation der konditionierenden Signale) aus 50 aufeinanderfolgenden Expositionen wurde als Kriterium für die Bewertung der Retention
- 30 bzw. Extinktion des erlernten Verhaltens verwendet.

Fig. 6 zeigt den Einfluß von 17b-Estradiol (schwarze Säulen), 17a-Estradiol (schraffierte Säulen) und 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (graue Säulen) auf die Aquisition und Retention eines neuen Verhaltensmusters bei ovariectomierten Ratten (offene Säulen; OVX). Die Sternzeichen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren (OVX) am entsprechenden Testtag. Die folgenden Uterusgewichte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; n = 8-10 pro Behandlungsgruppe; Angaben in mg/100g KG) wurden nach 14-tägiger Behandlung ermittelt: OVX, 53 ± 2 ; 17b-Estradiol, 187 ± 9 ; 17a-Estradiol, 100 ± 5 ; 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol, 108 ± 4 .

Es ist ersichtlich, daß die Substanz 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol in der verwendeten Dosierung einen estrogen-ähnlichen stimulierenden Effekt auf die Retention des erlernten Verhaltensmusters hat, wobei die uterotrope Wirkung signifikant geringer ist, als diese von 17b-Estradiol in einer täglichen Dosis von 1 μ g. Dieses Ergebnis weist nach, daß 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol die kognitive Leistung wie ein Estrogen beeinflusst, während in reproduktiven Organen eine geringfügige proliferative Wirkung zeigt.

Beispiel 7

Biotransformation von 17a-Hydroxy-14,15a-methylen-estra-,3,5(10),8-tetraen-3-ol und 17a-Estradiol zu 17b-Estradiol

Ovariectomierte Ratten erhielten tägliche subkutane Dosen von 100 μ g 17a-Estradiol, 30 μ g 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol bzw. 1 μ g 17b-Estradiol über 7 Tage (vgl. Beispiel 6). Am letzten Behandlungstag wurden die Serumkonzentrationen von 17b-Estradiol in den drei Versuchsgruppen ermittelt und mit denenjenigen bei vehikel-behandelten Kontrolltieren verglichen.

Fig. 7 zeigt Serumwerte von 17b-Estradiol nach einer 7-tägiger subkutaner Behandlung ovariectomierter Ratten mit 17b-Estradiol (schwarze Säule), 17a-Estradiol (schraffierte Säule) und 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol (graue Säule) in den angegebenen Dosierungen. Sternzeichen bezeichnen signifikante Differenzen im Vergleich zu den Werten, die bei Placebo-behandelten Tieren gemessen wurden; die Letzteren waren unterhalb der Nachweisgrenze der Methode; jede Behandlungsgruppe bestand aus 7 Tieren.

10

Es ist ersichtlich, daß nach der Applikation von 17b-Estradiol und 17a-Estradiol in den erwähnten Dosierungen meßbare Konzentrationen von 17b-Estradiol im Serum registriert werden. Chronische subkutane Behandlung mit 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol verursacht keinen Anstieg der endogenen 17b-Estradiolspiegel. Dieses Ergebnis weist darauf, daß die beobachteten pharmakologischen Effekte nach der Verabreichung von 15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol nicht auf eine Biotransformation der Substanz zu 17b-Estradiol zurückzuführen sind.

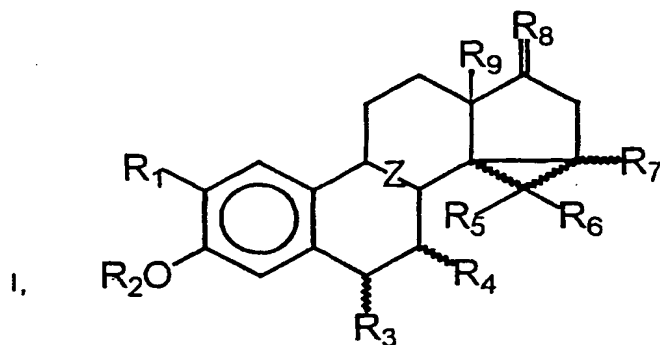
20

Patentansprüche

1. Verwendung von Steroiden der allgemeinen Formel I

5

10



15

wobei

R₁ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkyloxygruppe von 1 bis 5 C-Atomen darstellt,

R₂ ein Wasserstoffatom, eine Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen, eine Acylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen,

20

eine Gruppierung der allgemeinen Formel SO₂NR₁₀R₁₁,

wobei R₁₀ und R₁₁ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom, eine Alkylgruppe von 1 bis 5 C-Atomen oder zusammen mit dem Stickstoff eine

Pyrrolidino-, Piperidino- oder Morpholinogruppe

25

bedeuten,

R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe darstellt,

R₄ ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkylgruppe bis 5 C-Atomen bedeutet,

R₅ und R₆ unabhängig voneinander jeweils ein Wasserstoffatom

30

oder ein Halogenatom bedeuten,

R₇ für ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe steht,

R₈ ein Wasserstoffatom und eine Hydroxylgruppe, eine Oxogruppe

oder eine Gruppierung der allgemeinen Formel

35

CR₁₂R₁₃ bedeutet,

in der R_{12} und R_{13} unabhängig
voneinander jeweils ein Wasserstoffatom oder ein
Halogenatom darstellen,

R_9 eine Methyl- oder Ethylgruppe bedeutet,

5 Z für eine C,C-Doppelbindung oder einen substituierten oder
 unsubstituierten Cyclopropanring steht
und die Gruppierung $>CR_5R_6$ entweder α -oder β -ständig
angeordnet ist, wobei R_7 β -ständig ist, wenn $>CR_5R_6$ α -ständig ist
und umgekehrt,

10 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur gezielten
 Substitution des Estrogenmangels im Zentralnervensystem (ZNS)
 ohne Beeinflussung anderer Organe oder Systeme.

15 2. Verwendung von Steroiden nach Anspruch 1,
 wobei diese Steroide

15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -diol,
15 β H,3'H-Cycloprop[14,15]-18a-homo-estra-1,3,5(10),8-tetraen-
3,17 α -ol,

20 17 α -Hydroxy-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen
 -3-yl-pentanoat,

17-Methylen-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-
3-ol,

25 15 β H,3'H-3',3'-difluoro-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-
 tetraen-3,17 α -diol,

17-Methylen-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-
3-yl-sulfamat,

17-Difluoromethylen-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-
tetraen-3-ol,

30 3-Methoxy-15 β -methyl-3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-
 tetraen-3-ol,

15 α -Methyl-3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3,17 α -
diol,

17-Difluoromethylen-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10),8-tetraen-3-yl-(tetramethylenimino)sulfonat,
17-Methylen-3'H-cycloprop[8,9]-15 β H,3'H-cycloprop[14,15]-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol.

5

3. Verwendung von Steroiden nach Anspruch 1 und 2
zur Herstellung pharmazeutischer Präparate zur Prophylaxe und
Therapie
- 10 der altersabhängigen Verminderung der kognitiven Leistung,
der altersbedingten und perimenopausalen Dysphorie,
des premenstruellen Syndrom,
von Neurose und Neurasthenie,
von Angstzuständen und -neurosen,
- 15 von Hitzewallungen nach Estrogen-Deprivation (Menopause,
Gonadektomie, Behandlung mit GnRH-Analoga),
der psychogenen Hemmung des Sexualverhaltens.

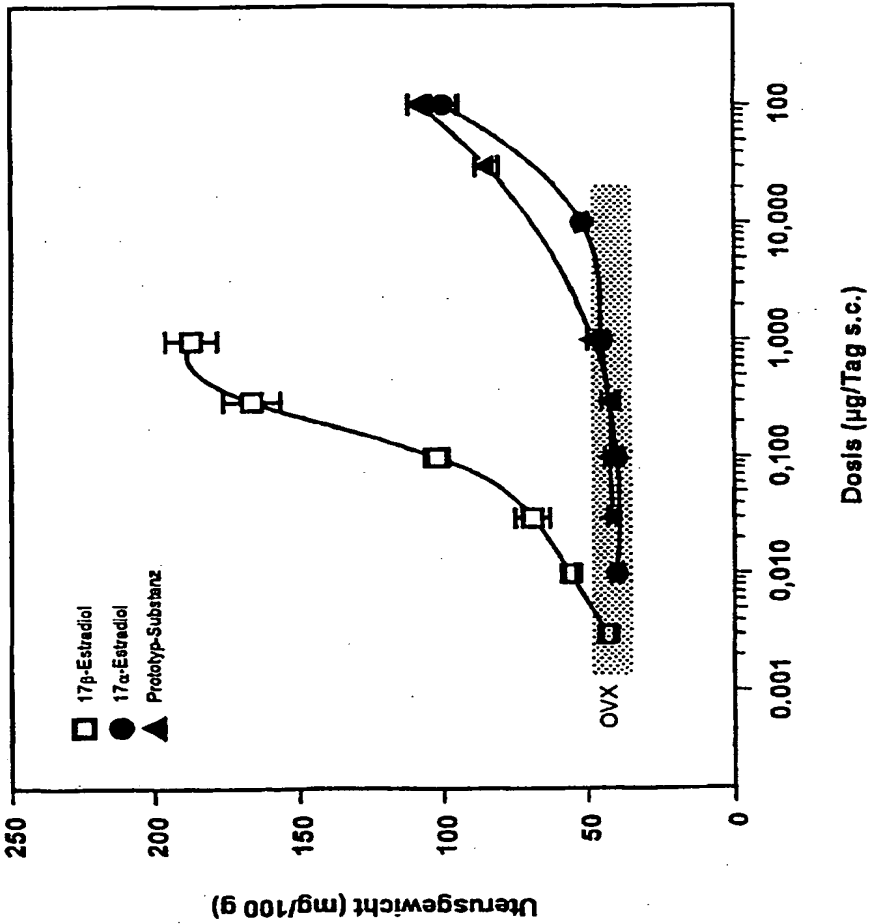


Fig. 1

2/7

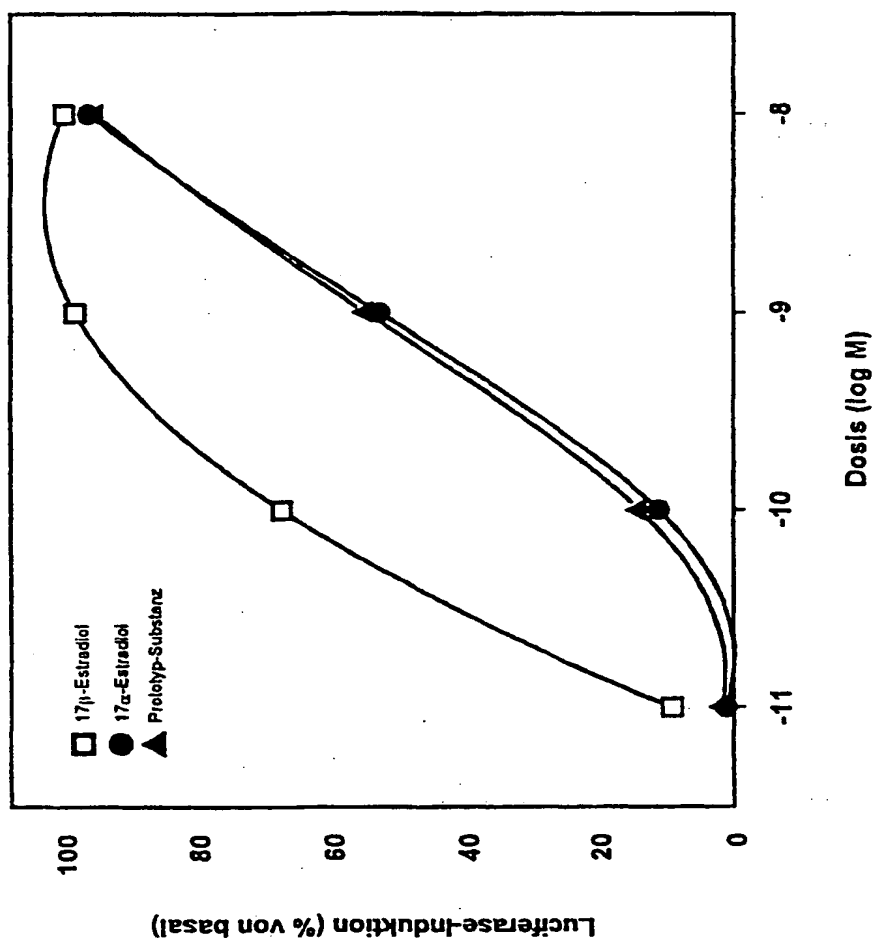


Fig. 2

3/7

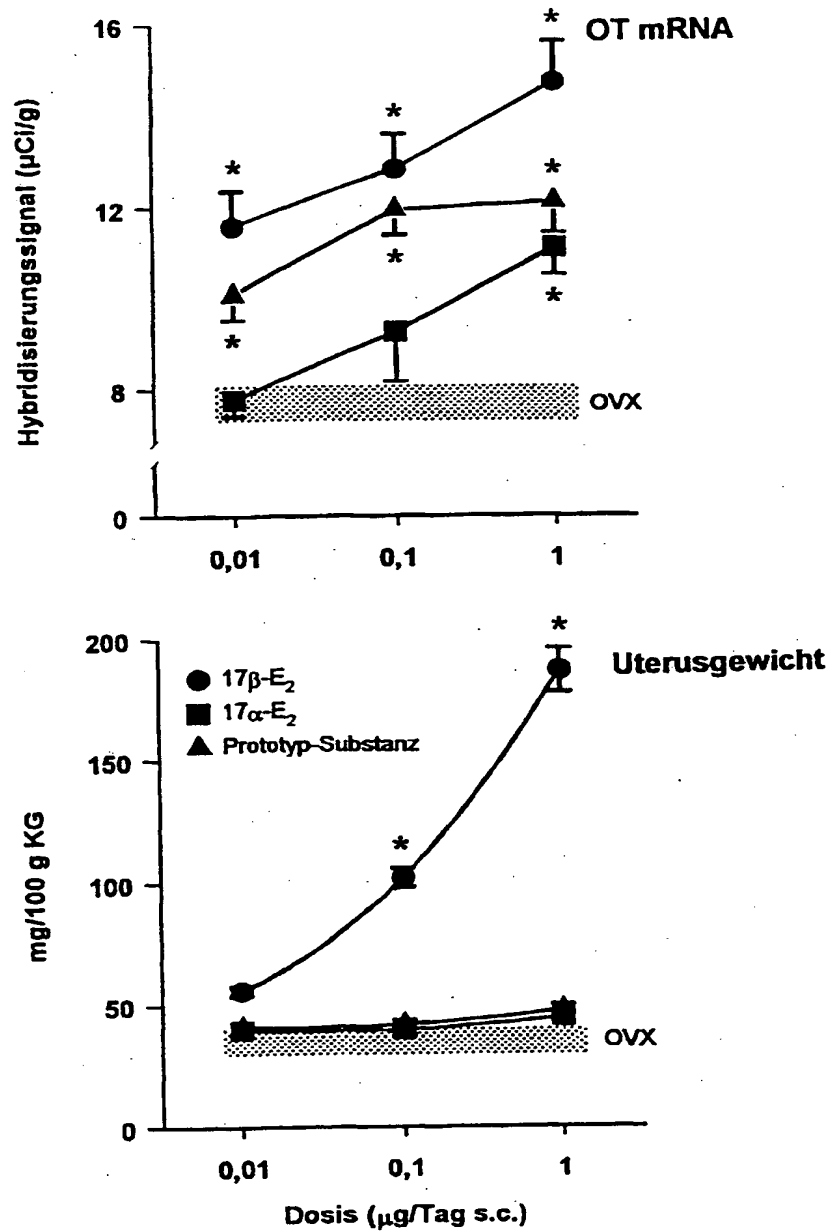


Fig. 3

4/7

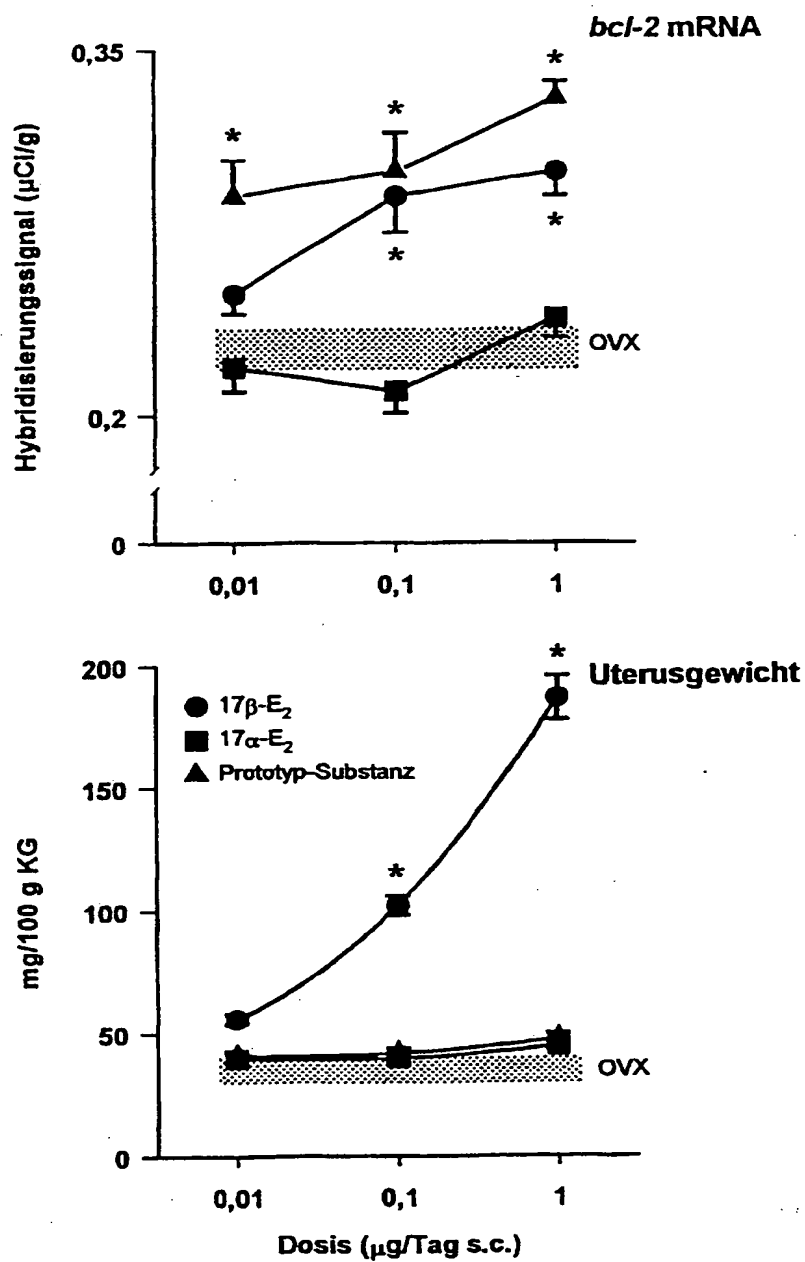


Fig. 4

5/7

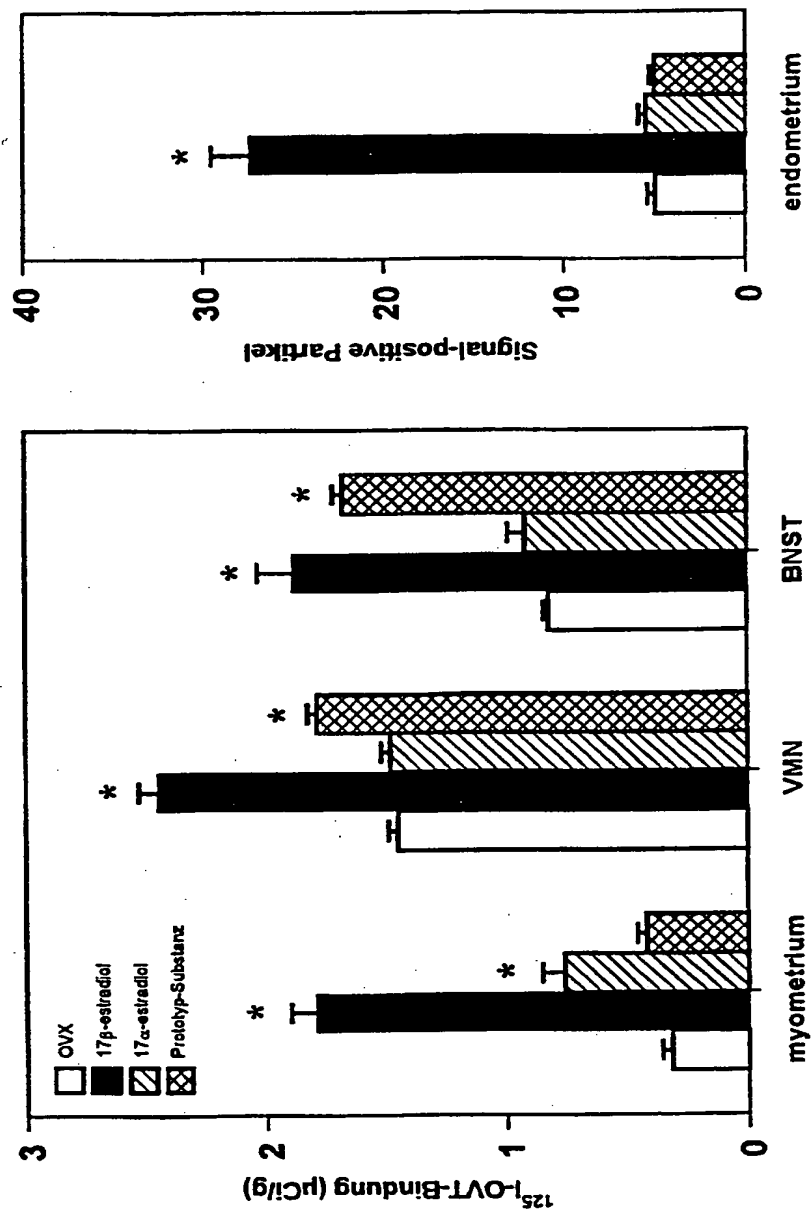


Fig. 5

6/7

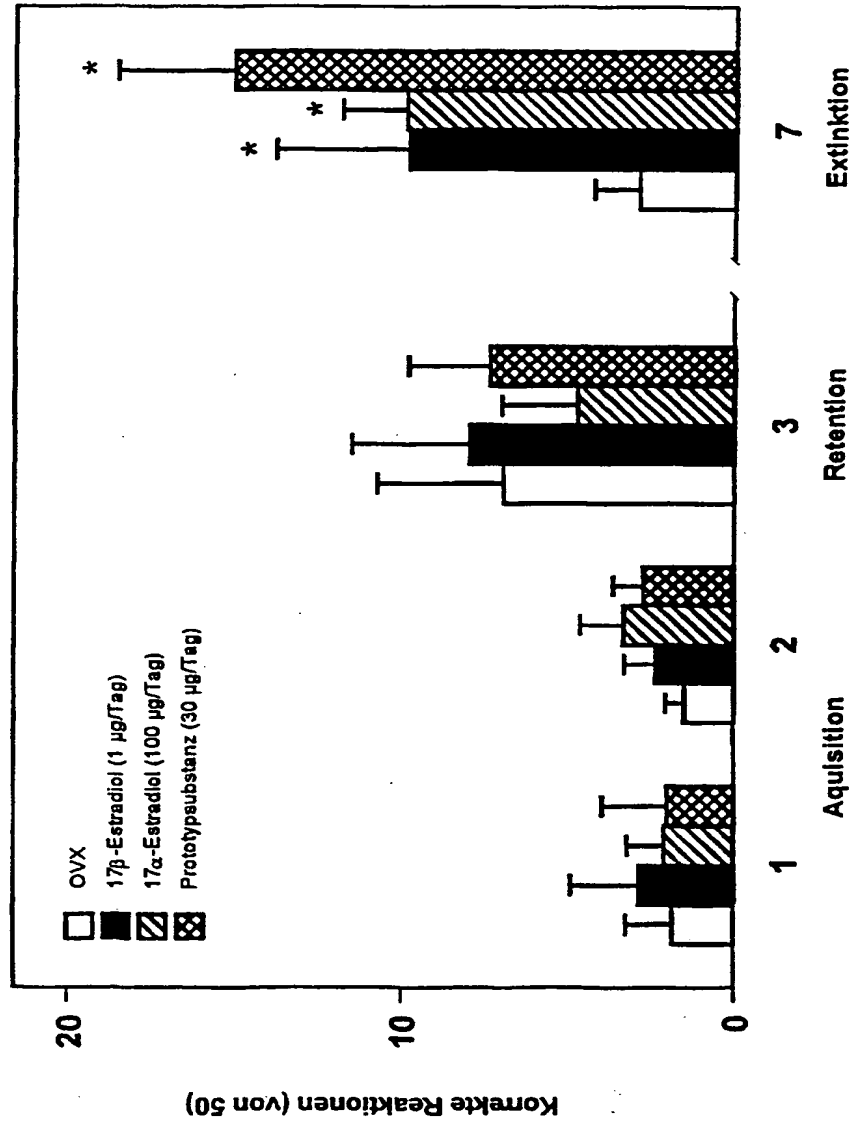


Fig. 6

7/7

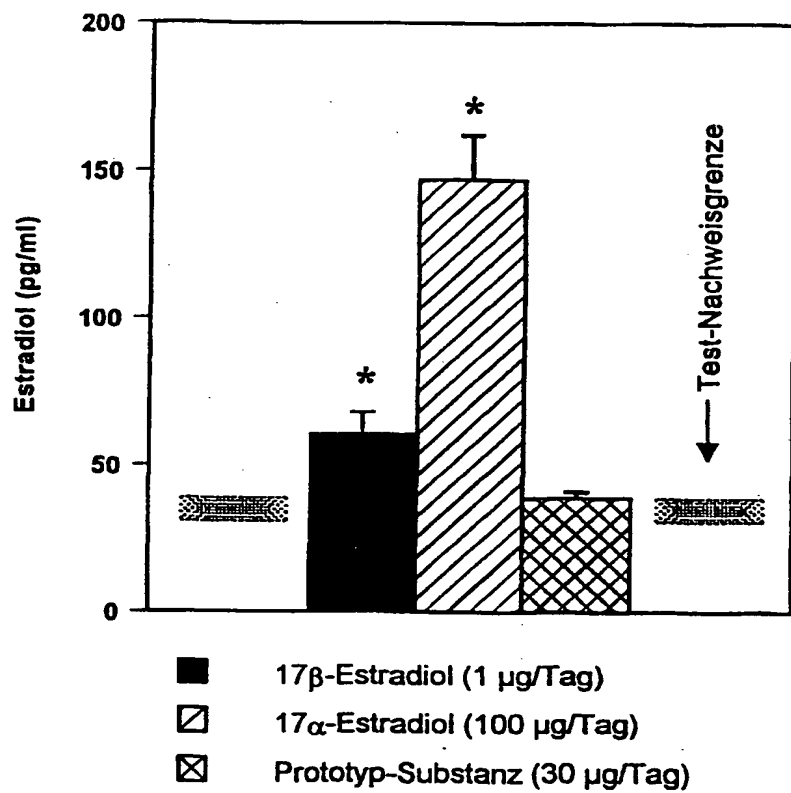


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/565 A61K31/57		International Application No PCT/DE 99/00353
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 12402 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION INC.) 11 May 1995 cited in the application see claims 1-46	1-3
A	DE 195 24 937 A (JENAPHARM GMBH) 9 January 1997 see page 3, line 28 - line 42 see claims 1-3 see page 3, line 17 - line 18	1-3
A	DE 44 29 397 A (JENAPHARM GMBH) 15 February 1996 see claims 1-4 see page 3	1-3
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 June 1999		Date of mailing of the international search report 15/06/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Siatou, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00353

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 42 39 946 A (JENAPHARM GMBH) 1 June 1994 see claims 1-4 ----	1-3
A	DE 43 38 314 C (JENAPHARM GMBH) 30 March 1995 cited in the application see claims 1,2 see page 4, line 25 - line 33 ----	1-3
A	WO 97 03661 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION INC.) 6 February 1997 cited in the application see claims 1-22 see table I ----	1-3
A	US 4 791 099 A (C. AROONSAKUL ET AL) 13 December 1988 see the whole document & US 4 897 389 A cited in the application -----	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/00353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9512402 A	11-05-1995	US 5554601 A	10-09-1996
		AU 699361 B	03-12-1998
		AU 1090195 A	23-05-1995
		CA 2175603 A	11-05-1995
		EP 0799041 A	08-10-1996
		US 5843934 A	01-12-1998
		US 5877169 A	02-03-1999
DE 19524937 A	09-01-1997	EP 0753300 A	15-01-1997
		JP 2765822 B	18-06-1998
		JP 9100292 A	15-04-1997
DE 4429397 A	15-02-1996	AU 699701 B	10-12-1998
		AU 2974195 A	07-03-1996
		BR 9508864 A	11-11-1997
		CA 2196694 A	22-02-1996
		CN 1156998 A	13-08-1997
		CZ 9700274 A	13-08-1997
		WO 9605216 A	22-02-1996
		EP 0775155 A	28-05-1997
		FI 970526 A	07-02-1997
		HU 77610 A	29-06-1998
		JP 10503180 T	24-03-1998
		NZ 289793 A	25-11-1998
		PL 318525 A	23-06-1997
		SG 47348 A	17-04-1998
DE 4239946 A	01-06-1994	NONE	
DE 4338314 C	30-03-1995	AU 8104194 A	29-05-1995
		CA 2176370 A	18-05-1995
		WO 9513076 A	18-05-1995
		EP 0728004 A	28-08-1996
		JP 2845625 B	13-01-1999
		JP 9507470 T	29-07-1997
WO 9703661 A	06-02-1997	AU 6507996 A	18-02-1997
		CA 2227634 A	06-02-1997
		EP 0841906 A	20-05-1998
US 4791099 A	13-12-1988	US 4898856 A	06-02-1990
		US 4902680 A	20-02-1990
		US 4898857 A	06-02-1990
		US 4897389 A	30-01-1990
		US 5017470 A	21-05-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00353

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/565 A61K31/57

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 12402 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION INC.) 11. Mai 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-46	1-3
A	DE 195 24 937 A (JENAPHARM GMBH) 9. Januar 1997 siehe Seite 3, Zeile 28 - Zeile 42 siehe Ansprüche 1-3 siehe Seite 3, Zeile 17 - Zeile 18	1-3
A	DE 44 29 397 A (JENAPHARM GMBH) 15. Februar 1996 siehe Ansprüche 1-4 siehe Seite 3	1-3

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Siatou, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00353

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 42 39 946 A (JENAPHARM GMBH) 1. Juni 1994 siehe Ansprüche 1-4 ----	1-3
A	DE 43 38 314 C (JENAPHARM GMBH) 30. März 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,2 siehe Seite 4, Zeile 25 - Zeile 33 ----	1-3
A	WO 97 03661 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION INC.) 6. Februar 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-22 siehe Tabelle I ----	1-3
A	US 4 791 099 A (C. AROONSAKUL ET AL) 13. Dezember 1988 siehe das ganze Dokument & US 4 897 389 A in der Anmeldung erwähnt -----	1-3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00353

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9512402 A	11-05-1995	US 5554601 A	10-09-1996
		AU 699361 B	03-12-1998
		AU 1090195 A	23-05-1995
		CA 2175603 A	11-05-1995
		EP 0799041 A	08-10-1996
		US 5843934 A	01-12-1998
		US 5877169 A	02-03-1999
DE 19524937 A	09-01-1997	EP 0753300 A	15-01-1997
		JP 2765822 B	18-06-1998
		JP 9100292 A	15-04-1997
DE 4429397 A	15-02-1996	AU 699701 B	10-12-1998
		AU 2974195 A	07-03-1996
		BR 9508864 A	11-11-1997
		CA 2196694 A	22-02-1996
		CN 1156998 A	13-08-1997
		CZ 9700274 A	13-08-1997
		WO 9605216 A	22-02-1996
		EP 0775155 A	28-05-1997
		FI 970526 A	07-02-1997
		HU 77610 A	29-06-1998
		JP 10503180 T	24-03-1998
		NZ 289793 A	25-11-1998
		PL 318525 A	23-06-1997
		SG 47348 A	17-04-1998
DE 4239946 A	01-06-1994	KEINE	
DE 4338314 C	30-03-1995	AU 8104194 A	29-05-1995
		CA 2176370 A	18-05-1995
		WO 9513076 A	18-05-1995
		EP 0728004 A	28-08-1996
		JP 2845625 B	13-01-1999
		JP 9507470 T	29-07-1997
WO 9703661 A	06-02-1997	AU 6507996 A	18-02-1997
		CA 2227634 A	06-02-1997
		EP 0841906 A	20-05-1998
US 4791099 A	13-12-1988	US 4898856 A	06-02-1990
		US 4902680 A	20-02-1990
		US 4898857 A	06-02-1990
		US 4897389 A	30-01-1990
		US 5017470 A	21-05-1991